

## Aplicación de un diseño factorial $2^3$ en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*

Wilson Ávila Ávila\*, Oscar J. Medina Vargas\*\*, Lucía M. Moreno Bastidas\*\*\*

Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Avenida Central del Norte 39-115, Código postal 150003, Tunja, Boyacá, Colombia.

\* Correo electrónico: wilson.avila@uptc.edu.co

\*\* Correo electrónico: oscar.medina@uptc.edu.co

\*\*\* Correo electrónico: lucia.moreno@uptc.edu.co

Recibido para evaluación: 12 de febrero de 2019

Aceptado para publicación: 10 de septiembre de 2019

### RESUMEN

El arándano (*Vaccinium meridionale*) forma parte de la familia Ericaceae; es un fruto rico en compuestos polifenólicos como antocianinas y flavonoides con propiedades antioxidantes, compuestos que presentan algunas características para la inhibición de radicales libres. Se empleó un diseño factorial  $2^3$  para investigar los efectos de las variables temperatura, tiempo y el porcentaje de etanol en la extracción asistida por microondas (MAE) de los antioxidantes presentes en frutos de arándanos, como técnica alternativa, con la cual se pretende una economía destacable en cuanto al empleo de disolventes, tiempo y energía, en comparación con los procesos de extracción convencionales. Las extracciones se realizaron bajo las siguientes condiciones: temperatura (343,15 -383,15 K), tiempo (5-15 minutos), %EtOH (0-80%). Se planteó un diseño factorial, con un total de 8 experimentos para determinar la influencia de la relación de las variables en el proceso de extracción de compuestos con actividad antioxidante por el método de DPPH-, obteniendo un modelo factorial de primer orden con interacciones, bajo un nivel de confianza del 100% y  $R^2=1$ . El diseño experimental y la evaluación de los resultados se realizó con el software R Studio® versión libre.

*Palabras clave:* DPPH-, *Vaccinium meridionale*, MAE, diseño factorial, antioxidantes.

## SUMMARY

### Application of a 2<sup>3</sup> factorial design in the assisted extraction by microwave and evaluation of the antioxidant activity of the compounds present in *Vaccinium meridionale* fruits

Blueberry (*Vaccinium meridionale*) forms part of the family Ericaceae; it is a fruit rich in flavonoids and anthocyanins (polyphenols), which have antioxidant properties and also shows some properties suitable for inhibition of free radicals. A 2<sup>3</sup> factorial design was performed to investigate the variables effects: temperature, time and the ethanol percentage %, on the antioxidants extraction process by Microwave Assisted Extraction (MAE). The extraction conditions were: temp (343.15-383.15 K), time (5-15 min), ethanol (0- 80%). A factorial design was performed, with a total of 8 experiments, allowing to determine the influence of the relation of the variables related to the extraction process of compounds with antioxidant activity by DPPH· method, getting a first order factorial model with interactions and a 100% reliability level and a R<sup>2</sup> =1. The experimental design and evaluation of the results were performed with the software R Studio® free version.

*Key words:* DPPH·, *Vaccinium meridionale*, MAE, factorial design, antioxidants.

## INTRODUCCIÓN

El estilo de vida actual de la humanidad ha causado la sobreproducción de radicales libres y de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el cuerpo humano, incrementando los niveles de estrés oxidativo [1]. El estrés oxidativo está asociado con el incremento de enfermedades tales como: diabetes, hipertensión, obesidad, cáncer, entre otras [2]; sin embargo, los antioxidantes son capaces de neutralizar y eliminar radicales libres y otras especies reactivas de oxígeno [3], protegiendo el cuerpo humano y evitando así el estrés oxidativo y las enfermedades asociadas [4].

El arándano (*Vaccinium meridionale*) forma parte de la familia *Ericaceae*, es un fruto nativo, que en Colombia se conoce como agraz o mortiño [1]; es aprovechado por comunidades rurales, que recolectan sus frutos en regiones (Departamentos) como Boyacá, Antioquia y Cundinamarca, de forma silvestre. Este fruto crece en altitudes de (2200-3400 m s.n.m.) [5, 6] y se puede considerar como una fruta rica en compuestos interesantes, antocianinas y flavonoides, los cuales contienen compuestos antioxidantes [7], con estructuras químicas que presentan algunas características que los hacen idóneos para estabilizar o desactivar radicales libres en el cuerpo humano [2].

En cuanto a técnicas de extracción de antioxidantes, se destaca la extracción asistida por microondas (MAE, por sus siglas en inglés) [8, 9]. En este tipo de procesos, una muestra de material vegetal inmerso en un solvente de naturaleza orgánica se expone a radiación microondas bajo condiciones controladas de temperatura y presión [10].

Consecuentemente, las moléculas de agua presentes en los sistemas vasculares de las plantas rompen los tejidos, liberan las biomoléculas allí contenidas y son progresivamente incorporadas al solvente [11]. Las ventajas de este proceso son los cortos tiempos de extracción, y una mayor eficiencia en uso de reactivos, y consecuente rendimiento de la reacción, así como una disminución en los costos, entre otras [12].

La metodología de diseño factorial 2K se ha convertido en una herramienta útil para la realización de diseños experimentales [13] que permiten la determinación de puntos altos y bajos de las condiciones de operación, a partir del análisis de los factores que afectan el valor de respuesta determinada, y un número de puntos experimentales relativamente pequeño [14]. En este caso, la metodología de diseño factorial 2K se ha empleado para determinar las condiciones de operación del equipo de microondas y extraer antioxidantes del fruto *Vaccinium meridionale* mediante MAE [15], en la que intervienen 3 variables.

El objetivo de este trabajo fue evaluar las condiciones de extracción de antioxidantes vía MAE teniendo en cuenta diferentes rangos de factores como: temperatura (T), tiempo (t) y concentración del solvente de extracción (% etanol) [16], en la obtención de antioxidantes a partir de frutos de *Vaccinium meridionale*, con ayuda de un procedimiento colorimétrico, que emplea el reactivo de DPPH· (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) [17, 18].

El método de DPPH· se basa en la reducción del radical DPPH· por los antioxidantes contenidos en la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes [19]. La decoloración del radical se determina a la longitud de onda ( $\lambda$ ) de 515 nm, hasta alcanzar el equilibrio. Las ventajas de este método son que el ensayo DPPH· es un método rápido y sencillo y que no requiere de un equipamiento sofisticado [20]. La desventaja, es que el reactivo sólo puede disolverse en medio orgánico y en algunos casos la interpretación resulta complicada, ya que algunos antioxidantes pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH· [21].

## METODOLOGÍA

El diseño experimental utilizado es un diseño tipo factorial 2K, con un valor de  $k=3$ . Se evaluaron los efectos de las variables seleccionadas: temperatura, tiempo y %EtOH

en frutos secos de *Vaccinium meridionale* con variables codificadas A, B y C respectivamente. En la tabla 1 se presentan los valores límite de estas variables, desde los niveles altos (+) y bajos (-) de experimentación [13, 14].

**Tabla 1.** Variables y niveles del diseño experimental.

Variable	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (+1)
A = temperatura (K)	343,15	383,15
B = tiempo (min)	5	15
C= % etanol (%EtOH)	0	80

**Tabla 2.** Diseño experimental factorial codificado y variables reales.

Orden	Temperatura (K)	Tiempo (min)	% etanol (%EtOH)
1	-1 (343,15)	-1 (5)	-1 (0)
2	1 (383,15)	-1 (5)	-1 (0)
3	-1 (343,15)	1 (15)	-1 (0)
4	1 (383,15)	1 (15)	-1 (0)
5	-1 (343,15)	-1 (5)	1 (80)
6	1 (383,15)	-1 (5)	1 (80)
7	-1 (343,15)	1 (15)	1 (80)
8	1 (383,15)	1 (15)	1 (80)

Se logró encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre la variable de respuesta TEAC (capacidad antioxidante equivalente a Trolox) y el conjunto de variables seleccionadas [22]. Se modeló la respuesta mediante regresión lineal de los factores, por medio de análisis de regresión lineal del diseño factorial, cuya función de aproximación es un modelo empírico de primer orden con interacciones según la ecuación (1). Los ensayos se ejecutaron por triplicado, aleatoriamente, para garantizar la validez estadística de los resultados [13, 22]:

$$y = \beta^{\circ} + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{13} A_1 B_2 + \varepsilon(\pm) \quad \text{Ecuación(1)}$$

Y: variable dependiente, TEAC Trolox (mg/g fruto seco)

A, B, C: variables independientes, (temperatura, tiempo, %EtOH)

$\beta^{\circ}$ : punto en el cual la recta intercepta el eje (ordenada en el origen)

$\beta_1$  : pendiente de la recta

$\varepsilon$ : error aleatorio.

## INSTRUMENTOS Y EQUIPOS

Se empleó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico 97%), de marca Merck™ como antioxidante de referencia, y DPPH· (2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo, D-9132), Merck™. Los frutos frescos de la especie *Vaccinium meridionale* fueron adquiridos en el mercado local de la ciudad de Tunja (Boyacá); posteriormente se analizaron en el Laboratorio de Química y Tecnología de Alimentos de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (Tunja, Boyacá) [14, 16, 19].

Los frutos se lavaron con agua destilada para remoción de impurezas tales como hojas, tierra y cuerpos extraños. Las muestras se sometieron a un proceso de secado bajo estufa con recirculación de aire, durante 2 horas a una temperatura de 45 °C grados. El registro de los espectros de absorción y las medidas de absorbancia, a longitud de onda fija, se llevaron a cabo con un espectrofotómetro Hach DR 5000. Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del *software* R Studio® versión libre [14, 23].

Para la obtención de los extractos del fruto *Vaccinium meridionale* se pesaron 200 mg de fruta seca y se mezclaron con 20 ml de la mezcla solvente {EtOH (del 96%) + agua} en porcentajes EtOH 0% (-1) y EtOH 80% (+1) a tiempo de 5 minutos (-1) y 15 minutos (+1) y temperatura de 343,15 K (-1) y 383,15 K (+1). Posteriormente, las muestras se llevaron al sistema microondas Sineo MDS-8G empleando las condiciones propuestas para el diseño experimental [14, 16]. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 4000 rpm, durante de 15 min, en una Centrífuga Hettich Rotina™. El sobrenadante obtenido se conservó para análisis posteriores y se denominó el extracto. Los extractos totalmente acuosos se almacenaron en un refrigerador a 4 °C, y los extractos con etanol en un congelador a -4 °C. Estos últimos extractos fueron analizados dentro de un período no superior a 24 horas después de la extracción para no comprometer la integridad de los analitos.

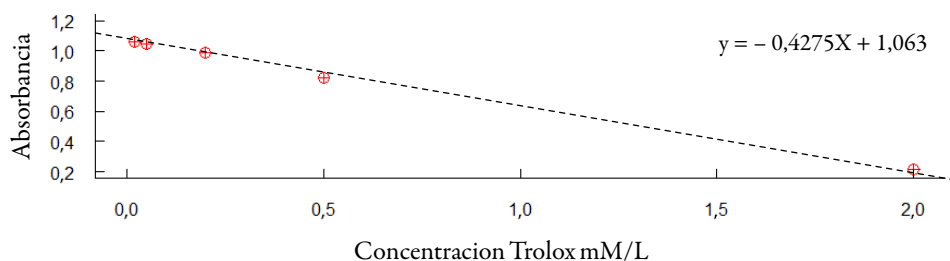
Actividad antioxidante método DPPH·: este método, desarrollado por Brand *et al.* [23], se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH·, por los antioxidantes presentes en la muestra. Con modificaciones el método descrito por Kim *et al.* [24], se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH· 100 mmol/L disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Después, se añade 0,2 mmol/L de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm

se realizan antes de añadir la muestra ( $A_0$ ) y pasados los 30 minutos ( $A_f$ ). La concentración de DPPH· en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal. Los resultados se expresan en TEAC, o actividad equivalente a Trolox (mg/g de muestra peso seco). El antioxidante sintético de referencia Trolox, a una concentración de 0,08-1,28 mmol/L en disolución de metanol al 80%, se analiza bajo las mismas condiciones, expresándose los resultados en TEAC (capacidad antioxidante en equivalentes Trolox) (mg/g fruto seco) [19].

Finalmente, para la determinación de actividad antioxidante por DPPH· se traza una curva de calibración para la técnica utilizando Trolox como compuesto antioxidante de referencia.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de obtener los diferentes extractos de *Vaccinium meridionale* se preparó una curva de calibración para la técnica utilizando Trolox como compuesto antioxidante de referencia [23], utilizando 5 soluciones patrón. La curva obtenida presenta un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9981$  (ver figura y tabla 3).



**Figura 1.** Curva de calibración DPPH·.

**Tabla 3.** Resumen del ANOVA, curva de calibración DPPH·.

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	Fuente	GL	SC	MC	F	P
0,01808	99,81	99,74	Regresión	1	0,504212	0,504212	1540,91	0,000
			Error	3	0,000982	0,000327		
			Total	4	0,505193			

Posteriormente se determinó el % de inhibición de acuerdo con la ecuación (2):

$$\%inhibición = \left[ \frac{(A_m - A_p)}{A_m} \right] * 100 \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde:

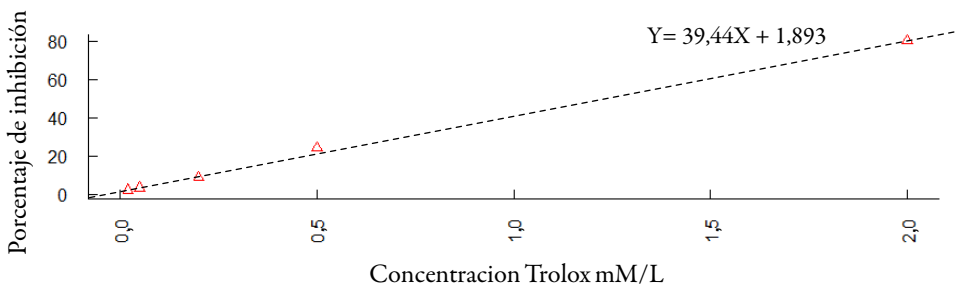
*Am*: absorbancia de la muestra control, se toma al inicio de la prueba.

*Ap*: absorbancias del patrón o muestras de los extractos las diferentes concentraciones.

Se graficó concentración de Trolox (mmol/L) y el porcentaje de inhibición para determinación de la actividad antioxidante TEAC. La curva de calibración, con las variables %inhibición vs. concentración de Trolox, mostró un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9981$  (ver tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen del ANOVA, curva de calibración DPPH· % de inhibición.

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	Fuente	GL	SC	MC	F	P
1,67101	99,81	99,74	Regresión	1	4290,32	4290,32	1536,49	0,000
			Error	3	8,38	2,79		
			Total	4	4298,70			



**Figura 2.** Curva de calibración DPPH· vs. porcentaje de inhibición.

### Determinación de la actividad antioxidante de los compuestos obtenidos por MAE

Espectroscopia UV-Vis. La actividad antioxidante de los extractos obtenidos por MAE de *Vaccinium meridionale* se midió frente a los radicales libres DPPH·. La medida de la actividad antioxidante por el método permite confirmar la contribución relativa de los diferentes compuestos presentes en el fruto estudiado. En la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de la actividad antioxidante por el método y de acuerdo con el diseño experimental utilizado en la investigación.

**Tabla 5.** Resultados codificados del diseño  $2^3$  por DPPH.

Ensayo	(A)	(B)	(C)	TEAC (mg/g)
1	-	-	-	1,78
2	+	-	-	2,78
3	-	+	-	2,82
4	+	+	-	4,65
5	-	-	+	2,97
6	+	-	+	4,79
7	-	+	+	4,55
8	+	+	+	5,74

**Análisis del modelo de regresión codificado para el diseño factorial  $2^3$ , de primer orden, en la extracción de antioxidantes de frutos de *vaccinium meridionale*, según las variables consideradas**

El objetivo del análisis de regresión es modelar de manera matemática el comportamiento de una variable de respuesta en función de una o más variables independientes. Los datos codificados a partir del diseño factorial  $2^3$  contemplan el número de tratamientos entre las combinaciones de las variables independientes codificadas como temperatura (A), tiempo (B) y % de EtOH (C) tabla (2). La respuesta como TEAC mostró diferencias significativas entre todos los tratamientos con un ( $p < 0,001$ ). Según el análisis de regresión codificado de la tabla 6, las variables A y C tienen un mayor efecto en el sistema, generando una mejora en la respuesta TEAC. Se observa que el único factor que no tiene un efecto significativo es B ya que su P-value es el único que se acerca a 0,001 [13, 25].

Se observa en la figura 3 que el modelo no es lineal y q hay una tendencia en los datos diferente a cero. La gráfica de distribución (normal Q-Q) muestra que el modelo no tiene comportamiento normal ya que todos los valores de TEAC no tienen un comportamiento lineal. Por ello, se realiza el análisis de residuales, comprobando que no hay evidencia para creer que los residuos no siguen la distribución normal. Los resultados obtenidos se llevaron a una gráfica de efectos (ver figura 4) que muestra la magnitud de la influencia de cada factor presente en el estudio, observando que no todos los factores son significativos ya que sus efectos son iguales [26], por tanto es necesario ajustar el modelo a un modelo lineal con interacciones y variables reales para determinar los factores de importancia en los niveles de estudio alto y bajo con los valores reales del diseño experimental planteado en la investigación [13, 18, 27].

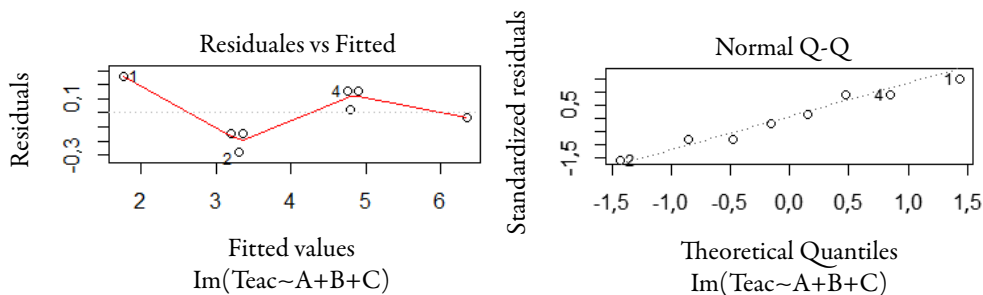


El modelo lineal sin interacciones no es estadísticamente significativo para la variable de respuesta TEAC. Se puede observar en la tabla 6, que si bien en la ecuación (1) el valor del error aleatorio es diferente de cero y que el valor  $R^2 = 0,977$ , con  $R^2$  ajustado = 0,9598, el modelo matemático no se ajusta en su totalidad a los valores experimentales de la investigación [28]. De esta forma, el modelo obtenido con un ajuste lineal, que considera los efectos y las interacciones significativas en el desempeño del método está enunciado en la ecuación (3) [13, 29].

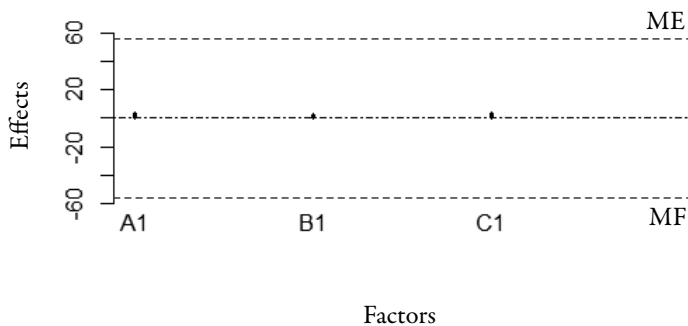
**Tabla 6.** Análisis del modelo de regresión codificado. Fórmula TEAC = A + B + C.

	Error estándar estimado	Error del modelo	t value	Pr(> t )
Intercepto	1,5975	0,1916	8,340	0,00113 **
A	1,4600	0,1916	7,622	0,00159 **
B	1,3600	0,1916	7,100	0,00208 **
C	1,5050	0,1916	7,857	0,00142 **

Códigos nivel significancia: 0 \*\*\*\* 0,001 \*\*\* 0,01 \*\* 0,05 \* 0,1 ' ' Error residual del modelo: 0,2709 en 4 grados de libertad (DF), R2: 0,977, R<sup>2</sup> ajustada: 0,9598 F-estadística: 56,77 en 3 y 4 DF p-value: 0,0009807.



**Figura 3.** Probabilidad normal de los efectos codificados sin interacciones.



**Figura 4.** Gráfico de probabilidad normal de los efectos.

Desarrollo de la ecuación (3) utilizando variables codificadas, para el nivel alto.

$$Y = \beta^{\circ} + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \varepsilon(\pm) \quad \text{Ecuación (3)}$$

$$Y = 1,5975 + 1,4600A_1 + 1,3500B_2 + 1,5050C_3$$

$$Y = 5,9125$$

### Determinación de la actividad antioxidante de los compuestos obtenidos por MAE (variables originales)

En la tabla 7 se observan los resultados del diseño experimental  $2^3$  con las variables originales que se utilizaron en el procedimiento analítico llevado a cabo en el equipo de MAE.

**Tabla 7.** Resultados variables originales del diseño  $2^3$  por DPPH.

Ensayo	Temperatura (K)	Tiempo (min)	Etanol (% EtOH)	TEAC (mg/g)
1	343,15	5	0	1,78
2	383,15	5	0	2,78
3	343,15	15	0	2,82
4	383,15	15	0	4,65
5	343,15	5	80	2,97
6	383,15	5	80	4,79
7	343,15	15	80	4,55
8	383,15	15	80	5,74

TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox (mg/g fruto seco).

### Análisis del modelo de regresión del diseño factorial $2^3$ de primer orden con interacciones (variables reales)

Actividad antioxidante TEAC. El análisis de regresión demostró que el modelo es altamente significativo como se puede observar en la tabla 8 y que, además, es evidente a partir del test de Fisher ( $F_{\text{modelo}} = 7$ ) con un muy bajo valor de probabilidad ( $P_{\text{modelo}} > 0,000$ ) [30]. El valor del coeficiente de determinación ajustada ( $R^2_{\text{ajustada}}$ ) es de 1, estadística que ofrece cierto indicio de la capacidad predictiva del modelo de regresión de la ecuación (5) que no presenta error aleatorio ( $\varepsilon$ ), como se puede observar en la tabla 9 y en el desarrollo de la ecuación (5) utilizando variables reales, para el nivel bajo y alto [31].

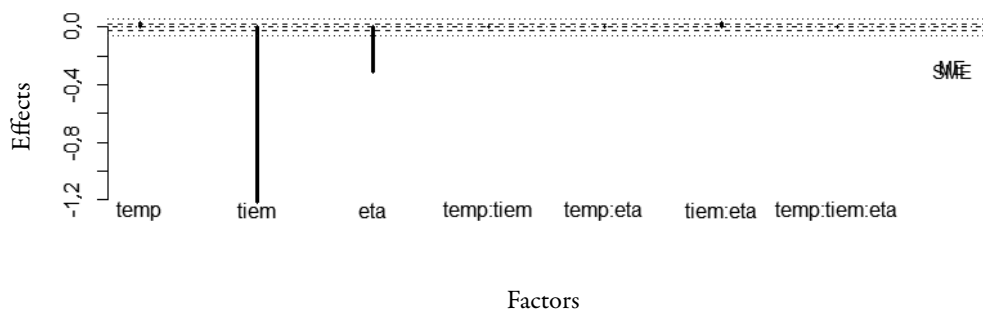
En cuanto el resultado del análisis experimental y el valor predicho por el modelo matemático de primer orden con interacciones se ajusta el modelo un nivel de confianza del 100% como se observa en la tabla 9, de otro lado, la figura 4 muestra que las variables que tienen un efecto más significativo son el tiempo y el %EtOH. Estos resultados son comparables a los reportados por otros autores, cuyo objetivo era extraer por MAE polifenoles de especies vegetales como Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) [32].

Es necesario realizar un análisis de los mecanismos de reacción de la forma como cada una de estas variables se comportan en relación con los sistemas solvente-variables físicas, y su efecto significativo en procesos de extracción asistida por microondas (MAE) de frutos de la especie *Vaccinium meridionale*, para determinar actividad antioxidante por el método DPPH· sobre la variable de respuesta en TEAC [13, 28].

**Tabla 8.** Análisis de regresión unidades originales con interacciones: fórmula TEAC= temperatura \* tiempo \* %EtOH.

	Error estándar estimado	Error del modelo	t value	Pr(> t )
Intercepto	- 3,759	NA	NA	NA
Temperatura	0,01463	NA	NA	NA
Tiempo	-0,608	NA	NA	NA
%EtOH	-0,1547	NA	NA	NA
Temperatura* tiempo	0,002075	NA	NA	NA
Temperatura* %EtOH	0,0004844	NA	NA	NA
Tiempo*%EtOH	0,01633	NA	NA	NA
Temperatura*tiempo*%EtOH	0,00004563	NA	NA	NA

(NA): no aplica error residual del modelo: NA en 0 grados de libertad (DF), R2: 1, R2 ajustada: NA F-estadística: NA, en 7 y 0 DF p-value: NA.



**Figura 5.** Grafica de efectos temperatura (temp) \* tiempo (tiem) \*%EtOH (eta).

Desarrollo de la ecuación (4) utilizando variables reales, para el nivel bajo y alto.

$$y = \beta^0 + \beta_1 A_1 + \beta_2 B_2 + \beta_3 C_3 + \beta_{12} A_1 B_2 + \beta_{13} A_1 C_3 + \beta_{14} B_2 C_3 + \text{Ecuación (4)}$$

$$\beta_{15} A_1 B_2 C_3 + \varepsilon(\pm)$$

Nivel bajo:  $Y = -3,759 + 0,01463(343,15) - 0,608(5) - 0,1547(0) + 0,002075(343,15*5) + 0,0004844(343,15*0) + 0,01633(5*0) - 0,00004563(343,15*5*0)$   
 $Y = -3,759 + 5,020 - 3,040 - 0 + 3,560 + 0 + 0 - 0$   
 $Y = 1,781$

Nivel alto:  $Y = -3,759 + 0,01463(383,15) - 0,608(15) - 0,1547(80) + 0,002075(383,15*15) + 0,0004844(383,15*80) + 0,01633(15*80) - 0,00004563(383,15*15*80)$   
 $Y = -3,759 + 5,605 - 9,120 - 12,376 + 11,925 + 14,847 + 19,596 - 20,979$   
 $Y = 5,740$

**Tabla 9.** Resultados obtenidos del diseño factorial 2<sup>3</sup> y predicción del modelo para actividad antioxidante sobre la variable de respuesta en TEAC.

Obser	Temperatura (K)	Tiempo (min)	%etanol (%EtOH)	TEAC (mg/g)	Ecuación 5 ajustada	$\varepsilon(\pm)$
1	343,15	5	0	1,78	1,78	0,00
2	383,15	5	0	2,78	2,78	0,00
3	343,15	15	0	2,82	2,82	0,00
4	383,15	15	0	4,65	4,65	0,00
5	343,15	5	80	2,97	2,97	0,00
6	383,15	5	80	4,79	4,79	0,00
7	343,15	15	80	4,55	4,55	0,00
8	383,15	15	80	5,74	5,74	0,00

TEAC: actividad antioxidante equivalente al Trolox (mg/g fruto seco).

### *Etanol y tiempo*

El coeficiente de correlación, R, mide la intensidad de la relación lineal entre las variables y varía entre -1 y 1, si R fue próximo a -1 indica que existió una fuerte relación lineal negativa entre las variables, señalando una disminución de TEAC al aumentar el tiempo de calentamiento o almacenamiento; si fue próximo a 0, no hubo correlación lineal; y si fue próximo a +1, hubo una fuerte relación lineal positiva entre las variables,

por lo que un aumento del tiempo y la concentración de etanol, implicaría un aumento de la TEAC [13, 29].

### *Análisis de regresión unidades originales interacción tiempo\*%EtOH*

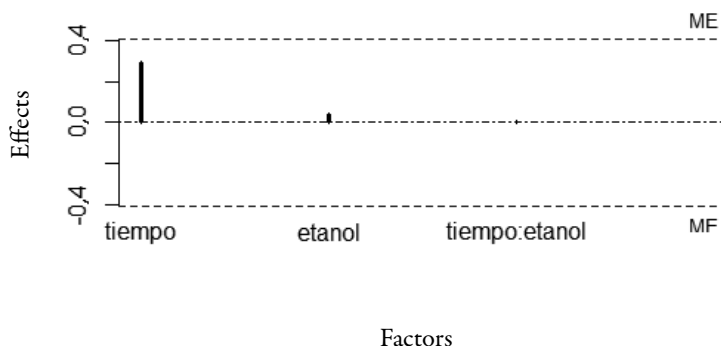
La finalidad del modelo de la ecuación 4 es reproducir el comportamiento de las variables tiempo\* %etanol. El modelo de primer orden con interacciones muestra que estas variables son las que tienen mayor importancia con respecto a la variable dependiente TEAC lo cual, a partir del análisis de regresión de la tabla 10, indica que el modelo R<sup>2</sup> es de 64% de la variabilidad en la respuesta del porcentaje de extracción de compuestos con propiedades antioxidantes, mientras que el R<sup>2</sup> ajustado es de 37%, lo que indica que las variables son altamente significativas.

**Tabla 10.** Análisis de regresión unidades originales interacción tiempo\* %etanol. Fórmula = TEAC ~ tiempo \*% etanol.

	Error estándar estimado	Error del modelo	t value	Pr(> t )
Intercepto	1,5525000	1,1909424	1,304	0,262
Tiempo	0,1455000	0,1065211	1,366	0,244
%etanol	0,0211875	0,0210531	1,006	0,371
Tiempo*%etanol	-0,0002375	0,0018830	-0,126	0,906

Error residual del modelo: 1,065 en 4 grados de libertad (DF), R2: 0,645, R<sup>2</sup> ajustada: 0,3788F-estadística: 2,423, en 3 y 4 DF p-value: 0,2061.

Los p-value obtenidos para las variables: tiempo (p<0,244), %EtOH (p<0,375) y la interacción tiempo\*%etanol (p<0,906) muestran que el tiempo es la variable que tiene mayor influencia en la respuesta TEAC seguido del %EtOH. La influencia en la respuesta del sistema ante cambios en las variables puede ser observada claramente en la siguiente figura:



**Figura 6.** Gráfica de efectos tiempo\*%EtOH.

Se desarrolló la ecuación 5 para las variables que tienen un efecto más significativo, para el nivel bajo y alto.

$$Y = \text{°} + B + C + BC + (\pm) \quad \text{Ecuación (5)}$$

$$\begin{aligned} \text{Nivel bajo } Y &= 1,5525 + 0,1455 (5) + 0,02118 (0) + \\ &-0,0002375 (5*0) \quad Y = 1,5525 + 0,727 + 0 + 0 \quad Y = 2,28 \end{aligned}$$

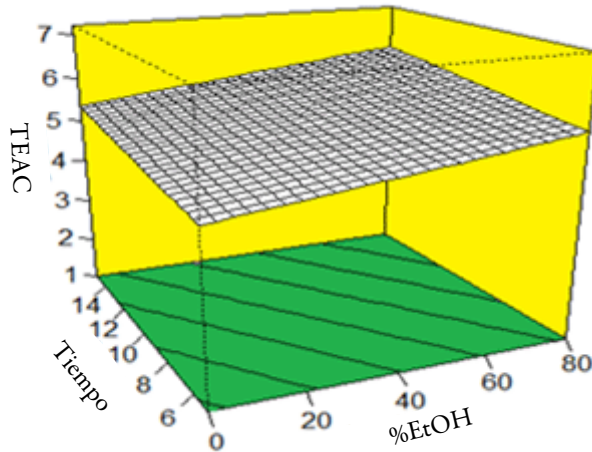
$$\begin{aligned} \text{Nivel alto } Y &= 1,5525 + 0,1455 (15) + 0,02118 (80) + \\ &-0,0002375 (15*80) \quad Y = 1,5525 + 2,1825 + 1,694 - 0,028 \quad Y = 5,401 \end{aligned}$$

Se observa que el impacto de la interacción de los factores tiempo y %EtOH es altamente positiva para el sistema, aumentando considerablemente el desempeño de procesos de MAE en frutos de la especie *Vaccinium meridionale*, para determinar actividad antioxidante por el método DPPH· sobre la variable de respuesta en TEAC.

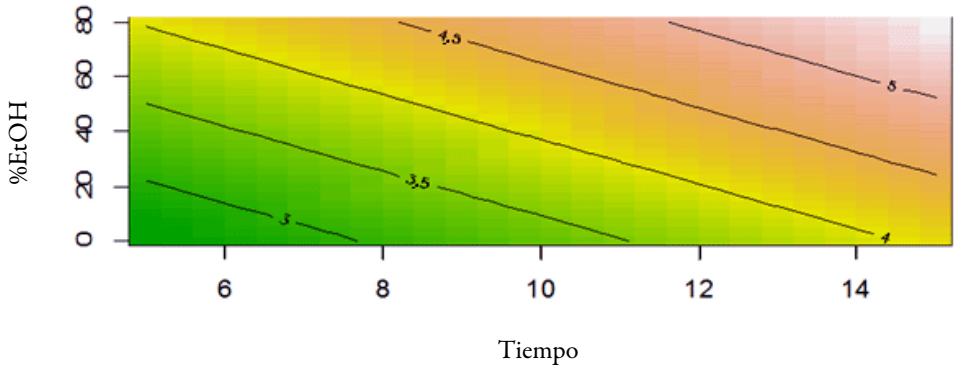
#### *Tiempo vs. %etanol*

El modelo obtenido del análisis de superficie de respuesta figura 7 y el análisis de contornos de la figura 8, de un modelo de primer orden con interacciones, indica que el comportamiento de las variables tiempo y etanol es directamente proporcional en el proceso, demostrando que estas son las variables con mayor un efecto sobre a la variable de respuesta, y en menor medida la temperatura ya que en el nivel bajo se tiene una respuesta de 2,8 TEAC y a medida que aumenta el tiempo y el %EtOH la variable de respuesta aumenta hasta 5,4 TEAC aportando cerca del 64% de eficiencia en la extracción [13, 31].

La superficie de respuesta obtenida muestra que el método propuesto para la extracción de antioxidantes de la especie *Vaccinium meridionale* no tiene un desplazamiento hacia puntos máximos o mínimos de las variables que intervienen en el proceso; por lo tanto, es posible observar que el comportamiento del método es directamente proporcional a los cambios en las variables.



**Figura 7.** Gráfica de superficie de respuesta efecto del tiempo (min)\* %EtOH sobre la extracción de antioxidantes.



**Figura 8.** Gráfica de contornos efecto del tiempo (min)\* %EtOH sobre la extracción de antioxidantes.

## CONCLUSIONES

En comparación con los métodos convencionales empleados para la extracción de compuestos con actividad antioxidante, presentes en frutas, el método de extracción asistida por microondas ofrece una alternativa con mayores atractivos en términos del ahorro energético, la reducción considerable de disolventes que pueden afectar las con-

diciones medioambientales y unos tiempos significativamente menores de proceso, que redundan de modo definitivo en la eficiencia del proceso.

La aplicación de un diseño factorial 2<sup>3</sup> en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale* Swartz demuestra que, en términos de diseño y modelamiento, puede ofrecer alternativas con resultados comparables con la aplicación de otros diseños estadísticos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Grupo de Investigación en Química y Tecnología de Alimentos, de Facultad de Ciencias de la Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia (UPTC).

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

1. N. Socorro, K. Arévalo, M. Verde, C. Rivas, M. Araday, M. Nuñez, M. Morales, Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schtdl (zarzamora), *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **43**, 66-71 (2011).
2. M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.*, **160**(1), 1-40 (2006).
3. M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**(1), 44-84 (2007).
4. E. Viado-Pupo, L. Gómez-Robles, I. Campana-Marrero, Estrés oxidativo, *Correo Científico Médico*, **21**(1), 171-186 (2017).
5. F. Chamorro, G. Nates, Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (*Ericaceae*) en los Andes orientales de Colombia, *Revista de Biología Tropical*, **63**(4), 1197-1212 (2015).



6. Y. Franco, B. Rojano, A. Alzate, D. Morales, M. Maldonado, Efecto del tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, antioxidantes y anti-proliferativa de néctar de agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz), *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, **66**(4), 261-271 (2016).
7. C. Gaviria-Montoya, J.D. Hernandez-Arredondo, M. Lobo-Arias, C.I. Medina-Cano, B.A. Rojano, Cambios en la actividad antioxidante en frutos de mortiño (*Vaccinium meridionale* Sw.) durante su desarrollo y maduración, *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellin*, **65**(1), 6487-6495 (2012).
8. G. Garzón, C. Narváez, K. Riedl, S. Schwartz, Chemical composition , anthocyanins , non-anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia, *Food Chem.*, **122**, 980-986 (2015).
9. M. Letellier, H. Budzinski, Microwave assisted extraction of organic compounds, *Analisis*, **27**, 259-271 (1999).
10. M. Gallo, R. Ferracane, G. Graziani, A. Ritieni, V. Fogliano, Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices, *Molecules*, **15**(9), 6365-6374 (2010).
11. Z. Liu, J. Wang, P. Shen, C. Wang, Y. Shen, Microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography purification of ferulic acid from *Radix Angelicae sinensis*, *Separation and Purification Technology*, **52**(1), 18-21 (2006).
12. B. Nayak, F. Dahmoune, K. Moussi, H. Remini, S. Dairi, O. Aoun, M. Khodir, Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels, *Food Chemistry*, **187**, 507-516 (2015).
13. D.C. Montgomery, *Diseño y análisis de experimentos*, 2ª ed., Limusa-Wiley, México, 2005, p. 170-301.
14. W.E. Espinosa-Manrique, L.C.A. Garzon-Salcedo, O.J. Medina-Vargas, Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana *Vaccinium meridionale*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **45**(1), 109-126 (2016).
15. L.M. Zapata, A.M. Heredia, C.F. Quinteros, A.D. Malleret, G. Clemente, J.A. Cárcel, Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, **25**(49), 166-192 (2014).

16. W.E. Espinosa, L.C.A. Garzón, O.J. Medina, Microwave-assisted extraction in dry fruit of andean species *Vaccinium meridionale*: Experimental conditions on the recovery of total polyphenols, *Ciência e Agrotecnologia*, **41**(6), 701-712 (2017).
17. R. Ramesh, R.J. Shakila, B. Sivaraman, P. Ganesan, P. Velayutham, Optimization of the gelatinization conditions to improve the expansion and crispiness of fish crackers using RSM, *LWT-Food Science and Technology*, **89**, 248-254 (2018).
18. J. Song, D. Li, C. Liu, Y. Zhang, Optimized microwave-assisted extraction of total phenolics (TP) from *Ipomoea batatas* leaves and its antioxidant activity, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, **12**, 282-287 (2011).
19. E. Marta-Kuskoski, A. Garcia-Asuero, A.M. Troncoso, J. Mancini-Filho, R. Fett, Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, **25**, 726-732 (2005).
20. A. Floegel, D.-O. Kim, S.-J. Chung, S.I. Koo, O.K. Chun, Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods, *Journal of Food Composition and Analysis*, **24**(7), 1043-1048 (2011).
21. L.J. Bernal-Rueda, *Evaluación de las propiedades bioactivas de mora (Rubus glaucus) y agraz (Vaccinium meridionale Swartz), en fresco y durante procesos de transformación*, Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, 2012, p. 48-80 .
22. S.S. Kashyap, P.R. Gogate, S.M. Joshi, Ultrasound assisted synthesis of biodiesel from karanja oil by interesterification : Intensification studies and optimization using RSM, *Ultrasonics Sonochemistry*, **50**, 36-45 (2019).
23. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Science and Technology*, **28**(1), 25-30 (1995).
24. D.-O. Kim, K.W. Lee, H.J. Lee, C.Y. Lee, Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(13), 3713-3717 (2002).
25. R. Tabarak, A. Nateghi, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology, *Ultrasonics Sonochemistry*, **18**(6), 1279-1286 (2011).

26. S. Sahin, O. Aybaster, E. Isik, Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of antioxidant compounds from *Artemisia absinthium* using response surface methodology, *Food Chem.*, **141**, 1361-1368 (2013).
27. M. Gamboa, F. Viquez, E. Cubero, Utilización del método de superficie de respuesta para formular una base de banano (*Musa AAA*) para batidos, *Rev. Venez. Cienc. Tecnol. Aliment.*, **1**(1), 81-94 (2014).
28. I.E. Garofulić, V. Dragović-Uzelac, A.R. Jambrak, M. Jukić, The effect of microwave assisted extraction on the isolation of anthocyanins and phenolic acids from sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca), *Journal of Food Engineering*, **117**(4), 437-442 (2013).
29. G. Cano, J. Velasquez, V. Fierro, Evaluación de los efectos producidos por la temperatura y la relación agente activante/carbón en la preparación de carbones activados para almacenamiento de hidrógeno, *Revista Investigaciones Aplicadas*, **2**(1), 15-21 (2008).
30. I. Miller, J. Freund, R. Johnson, *Probabilidad y Estadística Para Ingenieros*, 4ª ed., Prentice-Hall Hispanoamericana S.A, México, 2000, p. 160-488.
31. A. Arteaga, H. Arteaga, Optimización de la capacidad antioxidante, contenido de antocianinas y capacidad de rehidratación en polvo de arándano (*Vaccinium corymbosum*) microencapsulado con mezclas de hidrocoloides, *Scientia Agropecuaria*, **7**, 191-200 (2016).
32. J. Švarc-Gajic, Z. Stojanovic, A. Segura-Carretero, D. Arráez-Román, I. Borrás, I. Vasiljevic, Development of a microwave-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis*, *Journal of Food Engineering*, **119**(3), 525-532 (2013).

## CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

W. Ávila-Ávila, O.J. Medina-Vargas, L.M. Moreno-Bastidas, Aplicación de un diseño factorial 2<sup>3</sup> en la extracción asistida por microondas y evaluación de la actividad antioxidante de los compuestos presentes en frutos de *Vaccinium meridionale*, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, **48**(3), 643-661 (2019).